

А.В. Жаврид, В.И. Фадеев, М.Л. Пивовар

**ОЦЕНКА КАЧЕСТВА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ,
СОДЕРЖАЩЕЙ ЭКСТРАКТ СОИ****Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Проведен анализ биологически активной добавки к пище, содержащей экстракты сои, крапивы и семян тыквы, а также высушенный сок плодов американо-клубники. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлен изофлавоноидный состав исследуемого образца, включающий даидзеин, генистеин и их глюкозиды даидзин, генистин. Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием установлен жирнокислотный состав биологически активной добавки к пище, включающий пальмитиновую, линолевую, олеиновую и стеариновую кислоты. В статье приведены оптимальные условия пробоподготовки, УФ- и масс-спектры определяемых веществ. Описаны методики количественного определения изофлавонов и жирных кислот в биологически активной добавке к пище.

Ключевые слова: биологически активная добавка, изофлавоны, жирные кислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография, извлечение из сои.

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемиологические исследования показывают благоприятное воздействие на организм человека изофлавонов сои, которые снижают уровень холестерина, оказывают влияние на процессы восстановления плотности костной ткани и облегчают климатическую симптоматику [1–3].

Изофлавоны сои являются фенольными фитоэстрогенами, извлекаемыми из сои вида *Glycine max*, семейства Бобовые. Они делятся на 3 большие группы: изофлавоны, куместаны и лигнаны. В группе фитоэстрогенов сои изофлавоны являются наиболее фармакологически активными. Большая их часть представлена даидзеином и генистеином [1].

В литературе описано большое количество методик определения изофлавоноидного состава в продуктах питания и биологически активных добавках к пище (БАД к пище) [4]. Наиболее распространенными методами анализа являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в сочетании со спектрофотометрическим, электрохимическим или масс-спектрометрическим детектированием, газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, а также тонкослойная хроматография с денситометрическим детектированием [4–9]. Из нехроматографических методов все чаще встречаются различные варианты им-

мунохимического анализа, в частности иммуноферментный и поляризационный флуороиммуноанализ [4, 10, 11].

Для идентификации и количественного определения жирных кислот используют методы газовой хроматографии с масс-спектрометрическим и пламенно-ионизационным детектированием, высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, высокоэффективной эксклюзионной хроматографии, ядерного магнитного резонанса и спектроскопии комбинационного рассеяния [12–16]. Для обнаружения и количественного определения жирных кислот наиболее часто используют метод газовой хроматографии, так как при высокой чувствительности и воспроизводимости он не требует длительной пробоподготовки. Различные варианты этого метода включены в технические нормативные правовые акты по определению жирных кислот в пищевых продуктах [17–19].

В настоящее время на фармацевтическом рынке Республики Беларусь реализуется только одно лекарственное средство («Соя изофлавоноидный напиток», раствор для применения внутрь (Доктор Дюннер, Швейцария)), содержащее экстракт семян сои. Остальные продукты относятся к группе БАД к пище. Тем не менее, при регистрации БАД к пище обязательно проведение лабораторного определения содержания биологически активных веществ. Разработка по-

добных методик затруднена как сложностью состава самого экстракта, оказывающего основное фармакологическое действие, так и содержанием большого количества дополнительных компонентов, вводимых в БАД к пище на этапе производства.

Целью настоящей работы являлся подбор экономически целесообразных аналитических методик для оценки качества БАД к пище, содержащих изофлавоны и жирные кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлась БАД к пище, представляющая собой таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, содержащая экстракты сои, крапивы и семян тыквы, а также высушенный сок плодов американской клюквы.

Среди описанных в литературе [4–9] методик идентификации изофлавонов наиболее экспрессной, легко воспроизводимой и доступной для большинства аналитических лабораторий являлась методика, предложенная И. В. Ходаковым [7], предусматривающая идентификацию полифенолов в экстрактах из лекарственного растительного сырья методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием. При воспроизведении методики, из-за отсутствия хроматографической колонки, предложенной автором, была использова-

на широко распространенная колонка Zorbax SB-C18, обладающая аналогичными свойствами и позволившая получить профили изофлавонов, идентичные профилям, представленным в работе [7].

Методики пробоподготовки и газохроматографического анализа были разработаны на основе результатов исследований изофлавоноидного и жирнокислотного состава изучаемой БАД к пище.

1. Идентификация изофлавонов

Для идентификации изофлавонов таблетки освобождали от оболочки, измельчали. 0,1 г (точная навеска) измельченного образца помещали во флакон вместимостью 10 мл и проводили экстракцию метанолом в расчете 1,00 мл метанола на 200 мг образца. Экстракцию проводили в ультразвуковой ванне в течение 10 минут, после чего экстракт центрифугировали и фильтровали надосадочную жидкость через мембранный фильтр.

Для идентификации и количественного определения изофлавонов использовали жидкостный хроматограф Agilent 1290. Полученные экстракты хроматографировали на колонке Zorbax SB-C18 (150 x 4,6 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали смесь метанола и раствора ортофосфорной кислоты 0,9 %. Режим хроматографирования приведен в таблице 1.

Таблица 1. – Градиент состава подвижной фазы при хроматографировании изофлавонов сои

Время, мин.	Содержание метанола, %	Режим элюирования
0 – 13	10 → 40	градиентный
13 – 20	40 → 53	градиентный
20 – 26	53 → 55	градиентный
26 – 40	55	изократический
40 – 41	55 → 10	градиентный
41 – 56	10	изократический

Скорость движения подвижной фазы – 0,5 мл/мин, температура колонки 40 °С, объем вводимой пробы 5 мкл. Рабочая длина волны 255 нм [7].

2. Количественное определение изофлавонов

Подготовка стандартного образца. Навеску рутину 1,0 мг (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 10,00 мл, растворяли в метаноле, доводили до метки тем же растворителем и перемешива-

ли. 40 мкл полученного раствора доводили до 1,00 мл смесью метанола и 0,9 % кислоты фосфорной 1:9. Массовая концентрация рутин в полученном растворе – 4 мкг/мл.

Подготовка исследуемого образца. Навеску 0,10 г (точная навеска) измельченных таблеток помещали в экстракционный флакон и проводили экстракцию 5,00 мл 90 % спирта этилового, содержащего 0,5 % кислоты серной, в течение 10 минут. 40 мкл полученного экстракта доводили до 1,00 мл смесью метанола и

0,9 % фосфорной кислоты (1:9, об./об). Полученный экстракт хроматографировали при описанных выше условиях [7].

Массу суммы изофлавонов в 1 таблетке относительно рутина рассчитывали по формуле (1):

$$X = \frac{m_2 \times S_1 \times m_{\text{cp}}}{S_2 \times m_1} \times 0,5, \quad (1)$$

где X – масса суммы изофлавонов в 1 таблетке;

m_1 – масса навески испытуемого образца;

m_2 – масса навески рутина;

m_{cp} – средняя масса таблетки;

S_1 – площадь суммы пиков изофлавонов в испытуемом образце;

S_2 – площадь пика рутина;

0,5 – коэффициент разведения.

Рутин выбран в качестве маркерного стандартного вещества, так как является наиболее часто применяемым при стандартизации лекарственного растительного сырья веществом, содержащим флавоноиды, в том числе и в фармакопейных статьях ГФ РБ.

3. Идентификация жирных кислот

Для идентификации жирных кислот в виде их метиловых эфиров использовали универсальную методику скрининга с использованием неполярной неподвижной фазы DB-5 и режима программирования температуры. Режим программирования подбирался таким образом, чтобы для дополнительной идентификации была возможность использования линейных индексов удерживания Ковача, а время анализа не превышало 30 мин при возможности определения жирных кислот в ряду от C_{14} до C_{22} .

Подготовка исследуемого образца. Таблетки освобождали от оболочки и измельчали. Навеску 0,80 г (точная навеска) помещали в экстракционные флаконы и экстрагировали 1,5 мл гексана или ацетона в ультразвуковой ванне в течение 10 минут. Экстракты центрифугировали в течение 3 минут, затем отбирали и упаривали надосадочную жидкость. Сухие остатки растворяли в 0,5 мл гексана. К полученным растворам непосредственно перед введением в хроматограф прибавляли 0,5 мл нитрата метилата и встряхивали.

Анализ выполняли на газовом хроматографе с масс-селективным детектором Agilent 7690. Использовали капиллярную

колонку DB-5 ms Ultra Inert 15 м x 0,25 мм, 0,25 мкм. Температурный режим: 1) изотермический – 90 °С (выдержка 0,5 мин); 2) градиентный – нагрев 20 °С/мин до 325 °С (выдержка 2,75 мин). Время анализа – 20 мин. Газ-носитель – гелий, объемная скорость 3 мл/мин. Температура испарителя 280 °С, объем вводимой пробы 1 мкл. Ионизация электронами с энергией 70 эВ, температура источника электронов 300 °С, температура лайнера 180 °С.

4. Количественное определение жирных кислот

Для количественного определения жирных кислот подобраны условия: скорость изменения температуры и объемная скорость газа-носителя для обеспечения полного разделения идентифицированных методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием метиловых эфиров жирных кислот.

Подготовка стандартного образца. Навеску стандарта метилата кислоты линолевой 8,0 мг (точная навеска) растворяли в 1,30 мл гексана. 10 мкл полученного раствора доводили до 1,00 мл гексаном. Концентрация метилата кислоты линолевой в конечном растворе 60 мкг/мл.

Подготовка исследуемого образца. Подготовку образца проводили так же, как и при идентификации жирных кислот.

Анализ выполняли на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Кристалл 5000. Колонка HP FFAP 50 м x 0,32 мм, 0,5 мкм. Газ-носитель азот, объемная скорость 30 мл/мин. Температура испарителя 240 °С, температура детектора 240 °С. Температура термостата колонки 120 °С, скорость нагрева 8 °С/мин до 230 °С. Продолжительность анализа 20 мин. Объем вводимой пробы 2 мкл.

Определение массы суммы жирных кислот в 1 г образца (точная навеска) проводили по формуле (2). Исходя из того, что кислота линолевая является доминирующим соединением в жирнокислотном составе анализируемого извлечения, в качестве стандартного вещества был выбран метиловый эфир кислоты линолевой.

$$X = \frac{m_2 \times S_1}{S_2 \times m_1} \times 0,01, \quad (2)$$

где X – масса суммы жирных кислот в 1,0 г образца;

m_1 – масса навески испытуемого образца;

m_2 – масса навески стандарта метилата кислоты линолевой;

S_1 – площадь пиков жирных кислот в испытуемом образце;

S_2 – площадь пика метилата кислоты линолевой;

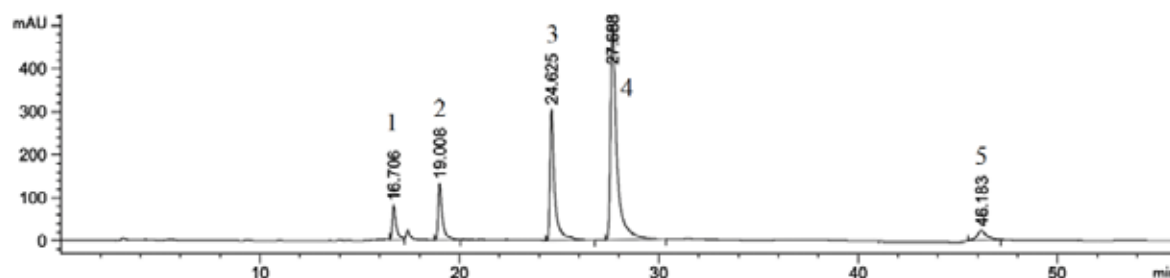
0,01 – коэффициент разведения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и количественное определение изофлавонов

Согласно литературным данным [1], в фенольной фракции семян сои преобладают изофлавоны дайдзеин (7,4'-дигидроксиизофлавоны), генистеин (5,7,4'-дигидроксиизофлавоны) и их 7-О-β-глюкозиды – дайдзин, генистин.

Идентификацию изофлавонов в образце проводили с применением ВЭЖХ на основе оценки степени сходства хроматографических профилей, полученных экспериментально с описанными в литературе [7]. На рисунке 1 представлена типичная хроматограмма исследуемого образца БАД к пище. По временам удерживания в экстракте семян сои идентифицированы следующие изофлавоны: дайдзеин – 16,8 мин., генистеин – 19,2 мин., дайдзина – 24,6 мин., генистина – 27,8 мин. Рутин в аналогичных условиях выходит со временем удерживания 46,18 мин.



1 – дайдзеин, 2 – генистеин, 3 – дайдзин, 4 – генистин, 5 – рутин.

Рисунок 1. – Хроматограмма полученного экстракта

Дополнительно, в целях повышения надежности идентификации, сравнивали УФ-спектры изофлавонов, полученные экспериментально и описанные в литературе. На рисунках 2-5 представлены спектры поглощения изофлавонов в анализируемом извлечении и спектры поглощения стандартных образцов соответствующих соединений [20].

Сырье, входящее в состав БАД к пище,

обладает переменным составом от партии к партии, что делает нецелесообразным количественное определение индивидуальных БАВ и приводит к многократному увеличению стоимости при проведении испытаний за счет использования значительного количества дорогостоящих стандартных образцов. В связи с этим проводили количественное определение не индивидуальных соединений, а суммы изофлавонов.

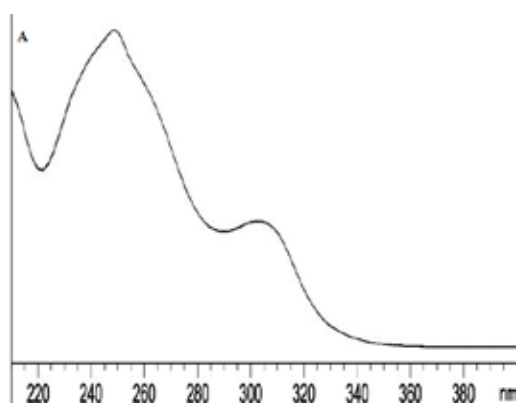


Рисунок 2. – Спектр поглощения дайдзина в анализируемом извлечении

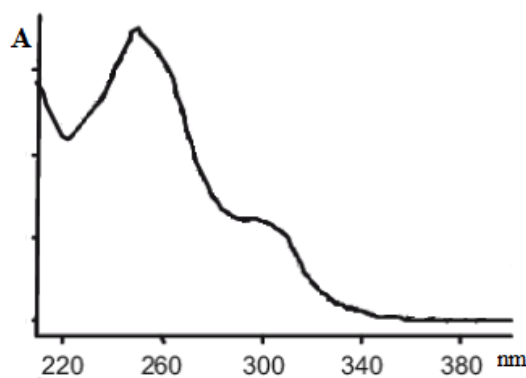


Рисунок 3. – Спектр поглощения дайдзина [14]

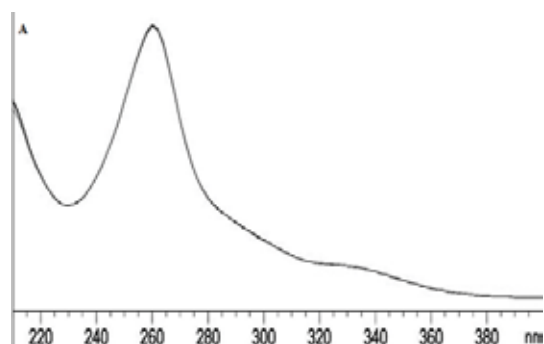


Рисунок 4. – Спектр поглощения генистина в анализируемом извлечении

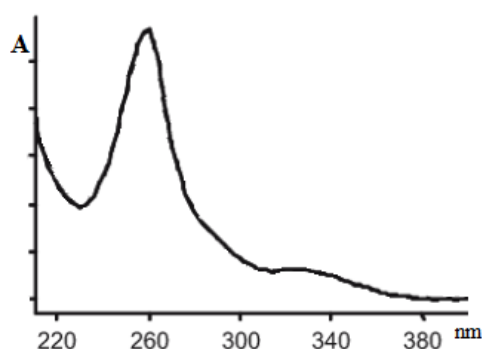


Рисунок 5. – Спектр поглощения генистина [14]

При разработке методики количественного определения суммы изофлавонов исследована возможность их извлечения 3 способами: в ультразвуковой ванне, в термостате и экстракция на водяной бане с гидролизом гликозидов.

В результате проведенного анализа извлечений установлено, что масса суммы изофлавонов в 1 таблетке образца при извлечении в ультразвуковой ванне составляет 9,2 мг, в термостате – 6,0 мг, на водяной бане с гидролизом гликозидов – 5,9 мг, из чего можно сделать вывод, что лучшие результаты по скорости и полноте извлечения изофлавонов дает извлечение в ультразвуковой ванне.

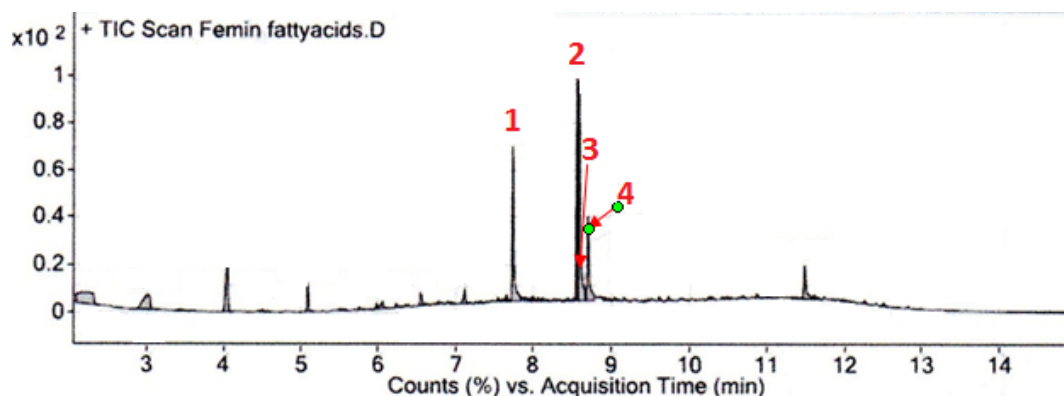
Идентификация и количественное определение жирных кислот

В связи с тем, что инструкцией по применению предлагается использование БАД к пище как источника жирных кислот, проводили их идентификацию и разработку методики количественного опре-

деления.

Установление качественного состава жирных кислот в составе исследуемой БАД к пище, проведенное методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволило установить, что в состав анализируемой БАД к пище входят пальмитиновая ($t_R = 7,73$ мин.), линолевая ($t_R = 8,56$ мин.), олеиновая ($t_R = 8,59$ мин.) и стеариновая ($t_R = 8,70$ мин) кислоты. Типичная хроматограмма извлечения представлена на рисунке 6.

Идентификацию жирных кислот проводили путем сравнения полученных масс-спектров хроматографических пиков с базой данных масс-спектров, имеющих в программном обеспечении хроматографа. Для примера, масс-спектр доминантного соединения (метилата линолевой кислоты) представлен на рисунке 7. Высокая степень идентичности полученных спектров с библиотечными позволила отказаться от дополнительной идентификации по индексам Ковача.



1 – пальмитиновая кислота, 2 – линолевая кислота,
3 – олеиновая кислота, 4 – стеариновая кислота.

Рисунок 6. – Хроматограмма экстракта, содержащего жирные кислоты

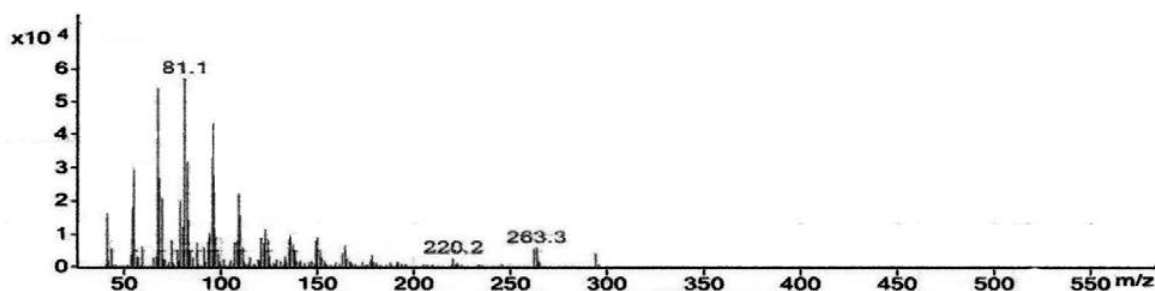


Рисунок 7 – Масс-спектр вещества, обуславливающего появление пика 2 (метилат линолевой кислоты)

При разработке методики оценивали эффективность органических растворителей гексана и ацетона для извлечения жирных кислот. В результате проведенного анализа гексановых и ацетоновых вытяжек установлено, что масса суммы жирных кислот в 1 г образца при экстракции гексаном составляет 10,02 мкг, ацетоном – 57,27 мкг, из чего можно сделать вывод, что ацетон экстрагирует жирные кислоты в 5,5 раза лучше гексана, что и было использовано при пробоподготовке.

Описанные в статье методики апробированы при оценке качества биологически активной добавки к пище «ФеминХелп» производства Natur Produkt Pharma Sp. z o.o, Республика Польша. При анализе указанной БАД к пище (серия 182172, n = 3) по предложенным методикам, количество изофлавонов в 1 таблетке, покрытой оболочкой составило $9,16 \pm 0,08$ мг, количество жирных кислот, в пересчете на кислоту линолевою $57,3 \pm 0,2$ мкг/г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Методом ВЭЖХ в биологически активной добавке к пище, содержащей экстракты сои, крапивы и семян тыквы, а также высушенный сок плодов американской клюквы идентифицированы изофлавоны дайдзеин, генистеин и их 7-О-β-глюкозиды дайдзин, генистин.

2. Для количественного определения суммы изофлавонов относительно рутина в БАД к пище предложена оригинальная методика пробоподготовки и расчета результатов анализа.

3. Идентификация жирных кислот проведена методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. В исследуемом образце БАД к пище обнаружены пальмитиновая, линолевая, олеиновая и стеариновая кислоты.

4. Количественный анализ суммы жирных кислот проведен по оригинальной методике методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором. При разработке методики количественного определения исследована эффективность органических растворителей для извлечения жирных кислот. Доказано, что лучшим экстрагентом является ацетон.

5. Предложенные методики апробированы при оценке качества биологически активной добавки к пище «ФеминХелп» производства Natur Produkt Pharma Sp. z o.o, Республика Польша.

SUMMARY

A. V. Zhauryd, V. I. Fadeev, M. L. Pivavar
QUALITY ASSESSMENT OF THE
BIOLOGICALLY ACTIVE FOOD
SUPPLEMENT CONTAINING SOYA
EXTRACT

Analysis of biologically active food supplements containing soybeans, nettle extracts and pumpkin seeds, as well as dried juice of American cranberry. Isoflavonoid composition of the test sample, including daidzein, genistein and their glucosides daidzin, genistin was established by the method of high-performance liquid chromatography. Fatty acid composition of the biologically active food supplement including palmitic, linoleic, oleic and stearic acids was established by the method of gas chromatography with mass spectroscopic detection. The article presents the optimal conditions for sample preparation, UV- and mass-spectra of the substances being defined. Techniques for the quantitative determination of isoflavons and fatty acids in a biologically active food supplement are described.

Keywords: biologically active food supplement, isoflavons, fatty acids, high performance liquid chromatography, gas chromatography, soy extract.

ЛИТЕРАТУРА

1. Isoflavone supplements containing predominantly genistein reduce hot flash symptoms: a critical review of published studies / P. S. Williamson-Hughes [et al.] // *Menopause*. – 2006. – Vol. 13, № 5. – P. 831–839.
2. Messina, M. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency / M. Messina, C. Hughes // *J. Med. Food*. – 2003. – Vol. 6, № 1. – P. 1–11.
3. Critical review of health effects of soybean phyto-oestrogens in postmenopausal women / A. Cassidy [et al.] // *Proc. Nutr. Soc.* – 2006. – Vol. 65, № 1. – P. 76–92.
4. Chromatographic quantification of isoflavones (Why and how) / G. Gryniewicz [et al.] // *Acta Chromatographica*. – 2005. – № 15. – P. 31–65.
5. Collison, M.W. Determination of total soy isoflavones in dietary supplements, supplement ingredients, and soy foods by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: collaborative study / M.W. Collison // *Journal of AOAC International*. – 2008. – № 3. – P. 498–500.
6. Хроматографическое исследование изофлавонов климактерического сбора / Т. В. Полуэктова [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2011. – № 2. – С. 145–148.
7. Ходаков И. В. Способ идентификации полифенолов в растительных экстрактах при помощи ВЭЖХ. Определение состава изофлавонов сои / И. В. Ходаков // *Методы и объекты химического анализа*. – 2013. – № 3. – С. 132–142.
8. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens / C. C. Wang, [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2002. – № 2. – P. 3–28.
9. Thin layer chromatography densitometric determination of soybean isoflavones in wild soybean (glycine soja) seeds / H. Meng [et al.] // *Asian Journal of Chemistry*. – 2012. – № 3. – P. 1322–1324.
10. The measurement of the isoflavone daidzein by time resolved fluorescent immunoassay: a method for assessment of dietary soya exposure / E. Kohen [et al.] // *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. – 1998. – № 3. – P. 217–222.
11. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites / S. Sakamoto [et al.] // *Journal of Natural Medicines*. – 2018. – № 1. – P. 32–42.
12. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography / K. Ichihara [et al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2010. – № 3. – P. 635–640.
13. A rapid GC-MS method for quantification of positional and geometric isomers of fatty acid methyl esters / J. Ecker [et al.] // *Journal of Chromatography B*. – 2012. – № 15. – P. 98–104.
14. Determination of the cultivar and aging of Sicilian olive oils using HPLC-MS and linear discriminant analysis / P. Agozzino [et al.] // *Journal of Mass Spectrometry*. – 2010. – № 9. – P. 989–995.
15. Detection of virgin olive oil adulteration using low field unilateral NMR / X. Zheng [et al.] // *Sensors*. – 2014. – № 2. – P. 2028–2035.
16. Line shape analysis of the Raman spectra from pure and mixed biofuels esters compounds / A. Miranda [et al.] // *Fuel*. – 2014. – № 3. – P. 118–125.
17. Масла растительные и жиры животные. Определение методом газовой хроматографии массовой доли метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот к их сумме: ГОСТ Р 51483-99 – Москва: Государственный стандарт Российской Федерации, 1999. – 11 с.
18. Масла растительные и натуральные жирные кислоты. Метод определения минеральных кислот : ГОСТ Р 5485-50 – Москва: Всесоюзный научно-исследовательский институт жиров, 1950. – 2 с.
19. Корма, комбикорма. Определение содержания жирных кислот/ Метод газовой хроматографии : ГОСТ Р ISO/TS 17764-2-2015. – Москва: Стандартинформ, 2015. – 16 с.
20. Rapidresolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavons in soy proteins and plant extract / B. Klejdus [et al.] // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2008. – № 389. – P. 2277–2285.

Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра токсикологической
и аналитической химии,
тел. моб.: +375-29-711-39-57,
e-mail: mikle_n@tut.by,
Пивовар М.Л.

Поступила 10.05.2019 г.